



TITLE:

タンパク質の動きについて：ミオグロビンを例にあげて(複雑な多谷ポテンシャルエネルギー面上で生起する動力的諸問題-力学的決定性と統計性の中間領域を探索(第1回)-,研究会報告)

AUTHOR(S):

水谷, 泰久

CITATION:

水谷, 泰久. タンパク質の動きについて：ミオグロビンを例にあげて(複雑な多谷ポテンシャルエネルギー面上で生起する動力的諸問題-力学的決定性と統計性の中間領域を探索(第1回)-,研究会報告). 物性研究 2001, 76(1): 127-133

ISSUE DATE:

2001-04-20

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/96968>

RIGHT:

タンパク質の動きについて：ミオグロビンを例にあげて

分子科学研究所 水谷泰久*

1. われわれの見方と立場

タンパク質で起きる酵素反応においては、活性部位が反応の触媒として働いていると同時に、その残りの部分は媒質として酵素反応が生理的に期待される方向へ起こるよう助けている。タンパク質で起きる酵素反応を液相における化学反応として捉えた場合、媒質としてのタンパク質は反応部位を取り巻く「溶媒」と考えることができよう。タンパク質で起きる化学反応(酵素反応)の特徴を理解するうえで、その媒質としての動的な性質(溶媒効果)を調べることは非常に重要である。このように液相のダイナミクスとパラレルな見方でタンパク質のダイナミクスを理解しようというのがわれわれのアプローチである。タンパク質は反応の前後で反応部位を安定化するように構造変化を起こすが、これは液体のダイナミクスの言葉を用いると、溶媒和の再配向にあたるものである。このようなはっきりとした向きをもった構造遷移と同時に、ランダムな構造遷移(揺らぎ)のダイナミクスが存在する。タンパク質はそのエネルギーポテンシャル面に多くのローカルミニマムを持ち、これに対応したconformational substate (cs)が存在する。これもやはり液体のダイナミクスの言葉を用いると、溶媒和の揺らぎにあたるものである。タンパク質はcsの間で絶えず熱的に揺らいでおり、その階層的なポテンシャル構造はフェムト秒から秒、サブオングストロームから数十オングストロームにわたる非常に幅広い揺らぎを生み出している。溶媒和やその揺らぎは液相に共通した問題であるが、タンパク質においては幅広い時間・空間スケールを持つという点でそれが特徴的に現れている。タンパク質のそのような運動には2種類のタイプの性質が考えられる。ひとつは速い時間領域で見られるモード的な運動であり、その変位はタンパク全体に広がっている。もうひとつは拡散的(ブラウン運動)な運動で、比較的局所的なもの(アミノ酸側鎖の向きを変える運動など)である。これはモード的な運動が崩れてしまった後の遅い時間領域に見られる。運動性の同様の区分けは液体についても考えられているが、タンパク質の場合各原子が共有結合でつながっているため、モード的な運動が液体の場合に比べより強く現れると予想される。タンパク質の運動がどれくらいの時間スケールまでモード的な寄与があるのかを考えるひとつの指標は、タンパク質の振動の非調和性である(この場合の非調和性はタンパクのポテンシャルにもともと含まれているものと溶媒によって静的・動的に引き起こされるもの両方を含む)。すなわち、非調和性が大きければモード的な運動は素早く崩れ、確率論的な運動になる。このようにタンパク内の振動緩和の問題はその運動の性質と深く関わっている。

表1. タンパク質の運動

時間領域	性質	表現	相関関数	空間的広がり	イメージ
速い	モード的	基準振動	ガウス型	タンパク全体	ばねと球
遅い	拡散的	FP 方程式	指数関数型	1 アミノ酸残基程度	霞

* 電子メール, yasuhisa@ims.ac.jp; ウェブページ, <http://web.molzo.ims.ac.jp/kitagawa/members/mizutani/profile-j.htm>

これらのタンパク質の運動を理解することは、凝縮相の分子科学の展開における重要な課題といえる。そこでわれわれは上に述べた次の3種類のダイナミクスについて研究を行っている。

- タンパク質の構造緩和(応答) \leftrightarrow 溶媒和の再配向
- タンパク質の揺らぎ(動的不均一性) \leftrightarrow 溶媒和の揺らぎ
- タンパク質の振動エネルギー緩和(動きの非調和性) \leftrightarrow 溶媒中のエネルギー散逸

溶液に比べタンパク質の場合、上記の3つの問題に対してアプローチしやすい利点がある。例えば、タンパク質の場合、X線結晶構造解析によって静的構造、すなわち「溶媒」の静的な分布関数をはっきりとわかっている事が多い。また、そのような構造は人工的なアミノ酸置換によって改変できる。

われわれは上に書いたような問題意識から最も基本的なヘムタンパク質であるミオグロビンのダイナミクスについて研究を行っている。ヘムタンパク質とは、ヘム(鉄ポルフィリン錯体の一種)を補欠分子として持つタンパク質の総称であるが、その中でもミオグロビンは構造が単純でありこれまでに最もよく研究されてきたタンパク質である(これをもってヘムタンパク質における「水素分子」という人もいる)。ミオグロビンは約150個のアミノ酸からなるポリペプチド鎖に1個のヘムを含んでいる。ヘムはヒスチジン残基を通してタンパク部分と結合しており、その反対側に酸素(O_2)、一酸化炭素(CO)、一酸化窒素(NO)などのリガンドが結合する。ミオグロビンの場合、活性部位とその周りを取りまくタンパクとは比較的独立しており、「ヘムという溶質がタンパクという溶媒に溶けている」という見方から研究を進めるのに向いている。われわれはミオグロビンのダイナミクスを調べるために、ヘムに結合したリガンドの光解離反応を利用している。リガンドが結合した状態では、ヘムはほぼ平面構造を持っており、鉄原子も平面内にある。これに対して、リガンドが結合していない状態ではヘムはややドーム形に変形し、鉄原子も平面からヒスチジン方向へずれる。上にあげたリガンドは可視光により光解離するが、光解離後このような構造変化はサブピコ秒でほぼ完了していることがわれわれの研究によって明らかになっている[1]。したがってヘムの変化はタンパク部分に対してステップ関数的な摂動を与える。このこともわれわれがミオグロビンを対象として選んでいる理由の一つである。すなわち、立ち上がりのだらだらとした摂動では、タンパク質の速い応答を調べることはできない。ヘムが時間的にシャープな摂動を与えるということはタンパクのダイナミクスを調べる上で重要な利点なのである。このようタンパク質の動きはタンパク質の機能の点でも意味を持っている。例えば、リガンド脱着によって誘起された一連のタンパク構造の変化はヘモグロビンの協同性を生み出す上で重要な役割を果たしていることが知られている[2]。タンパク質の研究では、いろいろなタンパク質を調べ、その共通する点、しない点を分類・整理することでタンパク質を理解するというアプローチもあるだろう。しかし、われわれは最も基本的な分子を徹底的に調べることによってタンパク質を理解するという立場でミオグロビンの研究を行っている。

われわれは実験手法として時間分解共鳴ラマン(time-resolved resonance Raman, TR³)分光法を用いて

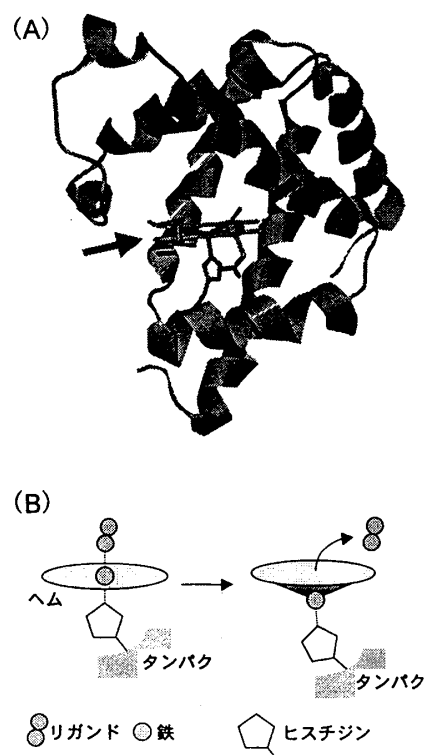


図1. (A)ミオグロビンの立体構造。矢印の部分が鉄ポルフィリン(ヘム)。下側に見える5員環がヒスチジンのイミダゾール環でその窒素原子が鉄に配位している。そのトランス位に O_2 , CO, NO などが結合する。(B)ヘム近傍の模式図。リガンドが結合した状態では、ヘムはほぼ平面構造を持っており、鉄原子も平面内にいて、低スピン状態をとる。これに対して、リガンドが結合していない状態(deoxy 形とよぶ)ではヘムはややドーム形に変形し、鉄原子も高スピン状態をとって近位ヒスチジン方向へずれる。

いる。その利点をあげると、TR³分光法の特徴・利点は、

- ラマン分光法は主に振動遷移をみるものであり、そのため分子構造について詳細な情報を与える。一般に、液相中では電子吸収スペクトルや蛍光スペクトルは、線幅が広くなり、振動モードごとの情報を取り出すことは非常に難しい
- タンパク質のような複雑な分子であっても共鳴効果によって選択的にある部分をプローブすることができる。同様に溶媒によるラマン散乱の影響をあまり受けずにすむ(赤外分光では水溶液の場合水の強い吸収による妨害が大きい)。
- ラマン分光法の場合、広い振動数領域が観測可能であるということ(赤外分光で広い振動数領域(300-3000 cm⁻¹)を測定することは困難である)。
- ラマン散乱には振動量子数が増える向きの遷移に対応するストークス散乱と振動量子数が減る向きの遷移に対応するアンチストークス散乱の2種類がある。アンチストークス散乱は振動励起状態からのみ生じるため、振動励起状態の選択的なプローブとなる。たとえば、アンチストークス/ストークスバンド強度比より振動温度を求めることができる。

などがあげられる。もちろん欠点もあり、

- 吸収や蛍光分光にくらべ感度が低い。
- 振動数分解能と時間分解能の限界はプローブ光のスペクトル幅とパルス幅で決まってしまう。

などがあげられる。しかし、タンパク質のダイナミクスを研究するうえでTR³分光法のもつ利点は重要であり、感度が低いことからくる実験上の困難さを考慮しても、その苦勞の見返りは十分に大きいとわれわれは考えている。

ここでは、われわれの研究も含めたミオグロビンのダイナミクスについてこれまでの研究をまとめる。より詳しい内容は最近のわれわれの総説を参照していただきたい[3, 4]。

2. タンパク質の構造緩和

前述のように、光解離に伴うヘム自体の構造緩和は非常に速い。この時間的にシャープな摂動に対するタンパク質の構造緩和を観測した実験結果を以下にまとめる。

屈折率異方性の変化 Millerのグループは光解離後のタンパク質の構造緩和を過渡回折格子による信号をヘテロダイン検出することによって調べた[5]。彼らは屈折率変化による信号を詳細に解析し、光解離500 fs以内にタンパク質の形が変化していると解釈した。ヘム平面に対して平行な成分と垂直な成分の変化の様子から、変形はヘム平面と垂直方向にタンパクが膨張するようなものであると解釈した。

アミドI吸収の変化 Dyerらは時間分解赤外分光法を使ってリガンド解離後のタンパクの構造変化を調べた[6]。彼らは赤外吸収スペクトルに現れるアミドIバンドと呼ばれるバンドに着目した。この吸収バンドは主にポリペプチド鎖のカルボニル基のCO伸縮振動によるもので、ポリペプチド鎖の構造を鋭敏に反映する。光解離後のアミドIバンドは6.8 psの時定数で変化することがわかった。CO結合形とdeoxy形との間の変化は小さく、2次構造は保ったまま3次構造が少し変わった程度の変化と考えられる。ピコ秒赤外吸収分光の結果は、その小さな変化のうちのおおかたが上記の時定数で完了していることを示唆している。

ヘムの円二色性変化 SimonらはNバンド(350 nm付近)のピコ秒円二色性変化を調べた[7]。Nバンドの円二色性は約100 psの時定数をもつ変化を示した。彼らはこの変化を、ヘムの遷移双極子モーメントとヘム近傍にあるアミノ酸残基の遷移双極子モーメントの相対的な向きの変化によるものであると解釈した。

鉄-ヒスチジン伸縮振動の変化 鉄-ヒスチジン結合はヘムとタンパクとをつなぐ唯一の共有結合であり、その伸縮振動の振動数はタンパク構造の影響を受ける。われわれは鉄-ヒスチジン伸縮振動($\nu(\text{Fe-His})$)のこのような性質に着目して、CO光解離後のこのラマンバンドの振動数変化を調べた[3, 4]。その結果、 $\nu(\text{Fe-His})$ 振

動数は、約100 psの時定数で 2 cm^{-1} 低波数シフトし、平衡状態の値へと近づく、ということがわかった。高粘性の溶媒中では低波数シフトの速度は遅くなり、またタンパク部分のないヘムのモデル化合物では低波数シフトは観測されなかった。したがって、この低波数シフトは光解離後のタンパク質構造の緩和に対応するものと解釈できる。ただし、観測された粘性依存性はそれほど大きくはなかった。すなわち、溶媒の粘性を40倍近く大きくしたにもかかわらず、振動数変化の速度は1/2から1/3程度にしか低下しなかった。このことはタンパク質の柔らかさを反映しているものと考えられる。

これらのデータから明らかになったイメージは次のようである。光励起後、数百fs秒以内に起こるCOの解離の後、ヘムの形がドーム形になる変化は1 ps以内にほとんどが完了する。このヘムの変形とほぼ同期して、Fヘリックス(ヘムが結合しているヘリックス)がヘムから離れる方向へ全体として動く。この動きがヘムと垂直方向のタンパクの膨張として過渡回折格子の信号に観測されたと考えられる。この動きが引き金となり、タンパク質の骨格構造は6-8 psの時定数でdeoxy形のものにかなり近づく。ただし、この変化はもともと小さなもので2次構造が変わるような大きな変化ではない。その後約100 psの時定数をもつヘム近傍の構造変化が認められるが、これはタンパク表面の変位も伴った比較的タンパク全体に広がった動きである。以上のように、ヘムの変形によって生じたタンパクの「歪み」を解消するように、新たな平衡構造に向かってタンパクの構造緩和が起きる。

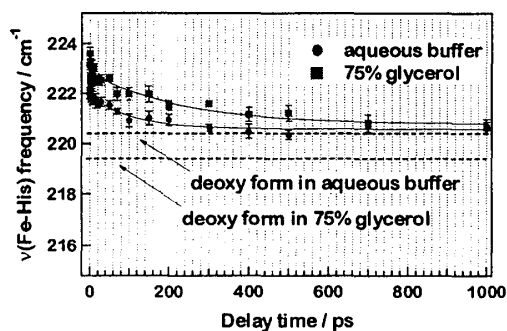
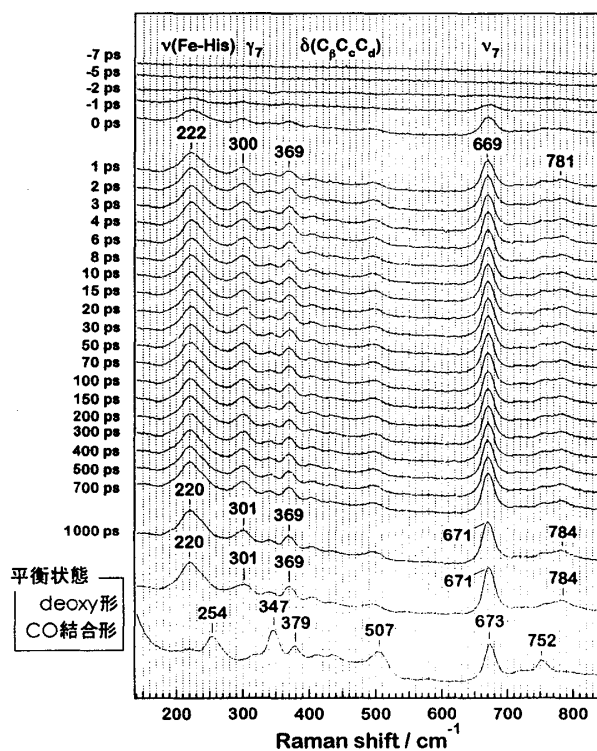


図2. (左) ミオグロビンの光解離後のストークス時間分解共鳴ラマンスペクトル。ポンプ光、プローブ光の波長はそれぞれ540 nm、442 nmで相互相関幅は2.3 ps。deoxy形とCO結合形の共鳴ラマンスペクトルを併せて示してある。

図3. (上) ミオグロビンの $\nu(\text{Fe-His})$ バンド波数の時間依存性。●印は50 mM Tris-HClバッファー中での結果、■印はグリセロールを75%含んだバッファー中での結果を表す。また、破線はそれぞれのバッファー中での平衡状態での値(すなわちdeoxy形の値)を表している。

3. タンパク質の振動エネルギー緩和

光解離のために照射した光(540 nm)はヘムの $\pi\pi^*$ 励起に使われ、約200 kJ/molのエネルギーを与え

たことに相当する。これはCOの解離反応に要するエネルギーのほぼ倍であるので、光子により与えられたエネルギーの約半分が余剰エネルギーとしてヘムに残ることになる。この余剰エネルギーによってヘムの振動励起状態が生成することが予測される。この余剰エネルギーが、ヘム→タンパク→水と散逸していく過程がいくつかの実験で観測されている。

ヘム→タンパク ヘムに生じた余剰エネルギーは周囲のタンパクへと緩和していく。振動エネルギー緩和過程を観測する最も直接的なプローブはアンチストークスラマン散乱である。われわれは時間分解アンチストークスラマンスペクトルをピコ秒の時間分解能で測定した[1]。アンチストークスバンドは装置の応答時間内で立ち上がり、その後速やかに減衰した。この変化を装置の応答関数を考慮に入れて、二つの指数関数でフィッティングした結果、減衰の時定数は $\tau_1=1.9\pm0.6$ ps (93%)、 $\tau_2=16\pm9$ ps (7%)と見積もられた。これらはいずれもミオグロビン中にあるヘムの振動エネルギー緩和(振動冷却)に由来するものである。 τ_1 に粘性依存性はほとんど観測されなかったことから、ヘム周囲のタンパクから感じる摩擦(力の相関関数)に溶媒の粘性はほとんど影響しないものと考えられる。

タンパク内の伝播 前述のアミドIバンド(主にCO伸縮振動)をピコ秒の赤外パルスを使って振動励起しその後の緩和を観る実験がPerersonらによって行われた[8]。彼らはアミドIバンドのエネルギー緩和時間として 1.2 ± 0.2 ps という値を得ている。同様の実験は他のタンパク質についてもなされており、タンパク質によらず非常に近い時定数が得られているのは興味深い[9]。アミドI振動はせいぜいヘリックス単位程度の広がりしかもたない比較的局在化した振動である。低振動の非局在化したタンパクの振動に関しては、実験的な困難さもありそれを經由したエネルギー伝播については現在のところあまりはっきりとわかっていないというのが現状である。

タンパク→水 Hochstrasserのグループは水の赤外吸収が温度に鋭敏に変化することを利用し、ミオグロビンまわりの水の温度上昇を測定した[10]。580 nmのパルス光によるCO光解離後の温度上昇は2相で起こり、速い相の時定数は 7.5 ± 1.5 ps (60%)、遅い方のそれは約20 ps (40%)であった。これらをヘムの冷却速度と比較するとタンパク内を熱エネルギーが伝播する速度が見積もられる。古典的な熱拡散モデルによって予測される時定数は遅い相のものに近い。これに対して、速い相(7.5 ps)は古典的な熱拡散モデルでは説明がつかない。おそらくタンパク質全体に非局在化した低振動数骨格振動が速いエネルギー伝播に関わっているのではないかと考えられるが、この点は今後の理論研究の展開に興味をもたれるところである。

また、最近Straubのグループは、ヘムのプロピオン酸基を經由したヘムから水への直接的なエネルギー移動の可能性を主張した[11]。

4. タンパク質の揺らぎ

揺らぎを検出するには主に、次の2種類の方法がある。

- 位相緩和を見る方法(非線形分光法、特にフォトンエコー)[12, 13]
- 非平衡な分布をつくり、その緩和を見る方法(ホールバーニング)[14, 15]

また、これ以外にも将来の可能性として、単一分子の実時間計測をあげることができる[16]。

ここでは、これまでに室温で観測されたミオグロビンの揺らぎについて紹介する。リガンドの脱着に関して重要な揺らぎとして次の2つをあげることができる。ひとつはリガンドの通過経路における揺らぎであり、もうひとつは鉄原子のヘム平面からの変位に関する揺らぎである。

リガンドの通過経路における揺らぎ Championのグループは、open form(リガンドが通り抜けやすい状態)とclosed form(リガンドが通り抜けにくい状態)の2つの状態を考慮することによって、リガンドの結合過程をうまくモデル化し、同時にこの2状態間の遷移速度について見積もった。彼らのエレガントかつ丁寧な研究については文献[17]にうまくまとめられている。彼らは速度論的にcsの非平衡な分布をつくり、それが 1.4×10^6 s⁻¹の速さで平衡な分布へ緩和することを見出した[15]。このことはリガンドの通過経路にマイクロ秒

前後の揺らぎがあることを示している。

鉄原子のヘム平面からの変位に関する揺らぎ 鉄原子のヘム平面からの変位には非常に大きな不均一性があることが知られている[17, 18, 19, 20]。鉄原子のヘム平面からの変位はリガンドの結合速度に影響を及ぼすと考えられる(変位が小さいほど結合速度は速い)。われわれはCO光解離後1 nsまでのピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定し、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンド形の変化に着目した。 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドのバンド幅は、COの解離後10-20 psの時定数で 1 cm^{-1} 程度の広がりを示した。われわれはいまのところ、バンドの広がり光解離後にできた鉄-ヒスチジン結合に関するcs間の非平衡な分布が緩和していく過程に対応しているのではないかと考えている。COが解離する前は、タンパクはCO結合形のポテンシャル面上でその細かなローカルミニマムに対応したcsの平衡分布を持つ。COの解離が起こるとこの分布は解離形のポテンシャル面上へ移されるが、タンパク質の動きに比べて解離は非常に早く起きるのでCO結合形のcs分布はそのまま解離形のポテンシャル面上へ投影されと考えられる。CO結合形のcsの平衡分布は解離形のポテンシャル面上においては平衡分布ではないので、この面上において新たな平衡分布に向かって緩和が起きると予想され、それがバンド幅の広がりとして観測されているのではないかと解釈している。

この他、低温(10 K-200 K)で揺らぎを観測した例があるが、ここでは文献をあげるにとどめる[21, 22]。

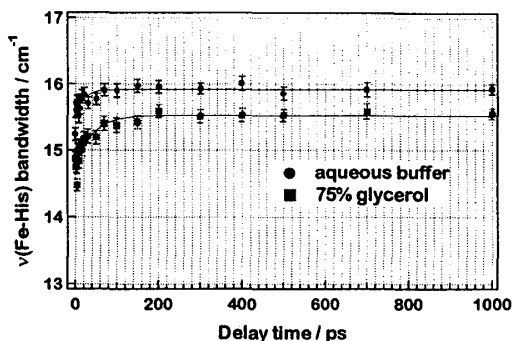


図4. ミオグロビンの $\nu(\text{Fe-His})$ バンド幅の時間依存性。●印は 50 mM Tris-HCl バッファー中での結果、■印はグリセロールを 75%含んだバッファー中での結果を表す。

謝辞 本稿で述べたわれわれの研究結果は、すべて岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター、北川禎三教授との共同研究の成果である。また、液体およびタンパク質の超高速現象の問題に目を向けるきっかけは、著者のポストドク時代のボスである米国・ペンシルバニア大学、Robin M. Hochstrasser教授による。共鳴ラマン分光とヘムタンパク質の面白さを教えてくださった北川教授と、超高速分光の面白さを教えてくださったHochstrasser教授に深く感謝する。

参考文献

- [1] Mizutani and Kitagawa, *Science* 278, 443 (1997).
- [2] 例えば、L. Stryer, *Biochemistry*, forth ed. Chapter 7 (W. H. Freeman, New York, 1995).
- [3] 北川禎三、水谷泰久、「ヘムタンパク質の超高速ダイナミクス」、超高速化学ダイナミクス(季刊化学総説No.43)、寺嶋正秀、山内薫編、学会出版センター、162 (2000).
- [4] Mizutani and Kitagawa, *The Chemical Record* 印刷中。
- [5] G. D. Goodno, V. Astinov, and R. J. D. Miller, *J. Phys. Chem. A* 103, 10630 (1999).
- [6] T. P. Causgrove and R. B. Dyer, *J. Phys. Chem.* 100, 3273 (1996).
- [7] X. Xie and J. D. Simon, *Biochemistry* 30, 3682 (1991).
- [8] K. A. Peterson, C. W. Rella, J. R. Engholm, and H. A. Schwettman, *J. Phys. Chem. B* 103, 557 (1999).
- [9] P. Hamm, M. Lim, and R. M. J. Hochstrasser, *Phys. Chem. B* 102, 6123 (1998).
- [10] T. Lian, B. Locke, Y. Kholodenko, and R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem.* 98, 11648 (1994).
- [11] D. E. Sagnella, J. E. Straub, and D. Thirumalai, *J. Chem. Phys.* 113, 7702 (2000).
- [12] C. W. Rella, A. Kwok, K. Rector, J. R. Hill, H. A. Schwettman, D. D. Dlott, and M. D. Fayer, *Phys. Rev. Lett.* 77, 1648 (1996).

- [13] M. Lim, P. Hamm, and R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15315 (1998).
- [14] Y. Shibata, A. Kurita, and T. Kushida, *Biochemistry* 38, 1789 (1999).
- [15] W. D. Tian, J. T. Sage, P. M. Champion, E. Chien, and S. G. Sliger, *Biochemistry* 35, 3487 (1996).
- [16] M. A. Bopp, A. Sytnik, T. D. Howard, R. J. Cogdell, and R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11271 (1999).
- [17] P. M. Champion, *J. Raman Spectrosc.* 23, 557 (1992).
- [18] V. Šrajer, L. Reinisch, and P. M. Champion, *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6656 (1988).
- [19] F. Parak and E. W. Knapp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7088 (1984).
- [20] W. Nadler, A. T. Brunger, K. Shölten, and M. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7933 (1987).
- [21] B. F. Campbell, M. R. Chance, and J. M. Friedman, *Science* 238, 373 (1987).
- [22] J. Huang, A. Ridsdale, J. Wang, and J. M. Friedman, *Biochemistry* 36, 14353 (1997).